

学校编码: 10384
学 号: 21620060153330

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

PRAK 磷酸化 Rheb 调节 mTOR 所介导的细胞能量应激反应

**Phosphorylation of Rheb by PRAK is Essential for mTOR
Mediated Cellular Energy Stress Response**

郑 敏

指导教师姓名: 韩家淮 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2009 年 月 日

论文答辩日期: 2009 年 月 日

学位授予日期: 2009 年 月 日

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2009 年 06 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

中文目录.....	i
英文目录.....	v
中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
第一章 前 言.....	4
1.1 细胞中的能量应激反应.....	4
1.1.1 简介.....	4
1.1.2 能量应激刺激物.....	4
1.2 AMPK 信号通路.....	5
1.2.1 AMPK 三聚体.....	5
1.2.2 AMPK 的激活物及其上游激活蛋白.....	6
1.2.3 AMPK 的下游底物蛋白及其功能.....	6
1.3 mTOR 信号通路.....	8
1.3.1 mTOR 的发现及其生化属性.....	8
1.3.2 mTOR 信号通路的激活物和 mTOR 的上游调节蛋白.....	9
1.3.2.1 氨基酸刺激通路.....	9
1.3.2.2 生长因子.....	9
1.3.2.3 细胞的能量水平.....	10
1.3.2.4 环境压力.....	11
1.3.3 mTOR 下游调节蛋白及其生物学功能.....	11
1.3.3.1 蛋白合成.....	11
1.3.3.2 转录调节.....	12
1.3.3.3 代谢调节.....	12
1.3.3.4 细胞自吞噬调节.....	12
1.3.4 mTOR 的反馈调节.....	13

1.3.5 Rheb 蛋白.....	13
1.3.5.1 Rheb 蛋白的发现及其生理生化属性.....	13
1.3.5.2 Rheb 的功能.....	14
1.3.5.3 Rheb 的调节以及其下游蛋白.....	14
1.4 p38-PRAK 信号通路.....	16
1.4.1 有丝分裂原激活蛋白激酶.....	16
1.4.2 p38 蛋白家族.....	16
1.4.2.1 p38 蛋白的发现.....	16
1.4.2.2 p38 蛋白家族成员.....	17
1.4.2.3 p38 激活物及其上游调节蛋白.....	17
1.4.2.4 p38 下游调节蛋白.....	18
1.4.3 PRAK 蛋白.....	19
1.4.3.1 PRAK 的发现.....	19
1.4.3.2 PRAK 的上游调节蛋白.....	19
1.4.3.3 PRAK 下游调节蛋白及其生物学功能.....	20
1.5 立题背景.....	21
第二章 材料和方法.....	22
2.1 实验材料.....	22
2.1.1 哺乳动物细胞株.....	22
2.1.2 质粒.....	22
2.1.3 酶、试剂盒及主要试剂.....	22
2.1.4 抗体.....	23
2.2 实验方法.....	23
2.2.1 表达载体的构建.....	23
2.2.2 细胞培养及转染.....	24
2.2.3 免疫沉淀.....	25
2.2.4 Phos-Tag SDS 凝胶电泳.....	25
2.2.5 细胞大小和存活率测定.....	25

2.2.6 体外激酶实验.....	26
2.2.7 Rheb 的鸟嘌呤核苷酸结合实验.....	26
2.2.8 等电聚焦和免疫印记.....	26
2.2.9 质谱和磷酸化位点分析.....	27
2.2.10 数据统计.....	27
第三章 结果和讨论	28
3.1 p38β-PRAK 参与 mTOR 所介导的细胞能量应激反应	28
3.1.1 p38 β ^{-/-} MEF 细胞对 2-DG 较野生型细胞表现出抗性.....	28
3.1.2 PRAK ^{-/-} MEF 细胞对 2-DG 较野生型细胞表现出明显的抗性.....	30
3.1.3 PRAK 基因可以重建 PRAK ^{-/-} MEF 细胞对 2-DG 的敏感性.....	32
3.1.4 PRAK ^{-/-} MEF 细胞对其它能量应激刺激物同样表现出抗性.....	34
3.1.5 过量表达 p38 β 或 PRAK 可以抑制 S6K1 的磷酸化.....	36
3.1.6 2-DG 可以激活 p38 β 或 PRAK.....	37
3.2 PRAK 与 Rheb 相结合并抑制其激活 S6K1 磷酸化的活性	40
3.2.1 AMPK 位于 PRAK 的上游.....	40
3.2.2 TSC2 位于 PRAK 的上游.....	42
3.2.3 Rheb 位于 PRAK 的下游.....	43
3.2.4 PRAK 可以和 Rheb 相互作用.....	43
3.2.5 PRAK 对 Rheb 活性的抑制作用依赖于 PRAK 的激酶活性.....	45
3.3 PRAK 磷酸化 Rheb 第 130 位丝氨酸	46
3.3.1 PRAK 体外磷酸化 Rheb.....	46
3.3.2 PRAK 体外磷酸化 Rheb 的第 130 位丝氨酸.....	46
3.3.3 PRAK 可以在哺乳动物细胞内磷酸化 Rheb 第 130 位丝氨酸.....	48
3.3.4 Rheb 的第 130 位丝氨酸的特异性分析.....	49
3.3.5 PRAK 的同源蛋白 MK2 无法磷酸化 Rheb 第 130 位丝氨酸.....	51
3.4 PRAK 通过磷酸化 Rheb 第 130 位丝氨酸抑制 Rheb 激活 mTOR 的活性	52
3.4.1 Rheb 第 130 位丝氨酸磷酸化对 Rheb 生化属性的影响.....	52

3.4.2 Rheb(S130A)对 S6K1 磷酸化的激活作用增强.....	56
3.4.3 Rheb(S130E)对 S6K1 磷酸化的激活作用减弱.....	57
3.5 PRAK 磷酸化 Rheb 第 130 位丝氨酸是 2-DG 导致 S6K1 磷酸化下降所必需的.....	58
3.5.1 2-DG 导致 PRAK 依赖的 Rheb 第 130 位丝氨酸磷酸化.....	58
3.5.2 Rheb(S130A)可以部分抑制 2-DG 引起的 S6K1 磷酸化下降.....	59
3.5.3 p38 β -PRAK 参与 mTOR 所介导的能量应激反应的信号通路模型.....	60
3.6 讨论.....	62
致谢.....	65
参考文献.....	66
图表索引.....	80
缩略语及中英文对照.....	82
在学期间发表论文.....	87

TABLE OF CONTENT

TABLE OF CONTENT (IN CHINESE)	i
TABLE OF CONTENT (IN ENGLISH)	v
ABSTRACT (IN CHINESE)	1
ABSTRACT (IN ENGLISH)	2
CHAPTER 1 Introduction	4
1.1 Cellular energy stress response	4
1.1.1 Introduction.....	4
1.1.2 Energy stress stimuli.....	4
1.2 AMPK signaling pathway	5
1.2.1 AMPK triplex.....	5
1.2.2 AMPK activator and upstream factors.....	6
1.2.3 AMPK downstream factors and its biological function.....	6
1.3 mTOR signaling pathway	8
1.3.1 mTOR discovery and its biochemical characteristics.....	8
1.3.2 mTOR activator and its upstream factors.....	9
1.3.2.1 Amino acid stimulation.....	9
1.3.2.2 Growth factor.....	9
1.3.2.3 Cellular energy level.....	10
1.3.2.4 Enviromental stress.....	11
1.3.3 mTOR downstream factor and its biological function.....	11
1.3.3.1 Protein translation.....	11
1.3.3.2 Transcriptional regulation.....	12
1.3.3.3 Metabolism regulation.....	12
1.3.3.4 Autophagy regulation.....	12
1.3.4 Feedback regulation.....	13
1.3.5 Rheb.....	13

1.3.5.1 Rheb discovery and its biochemical properties.....	13
1.3.5.2 Rheb biological function.....	14
1.3.5.3 Rheb regulation and its downstream factors.....	14
1.4 p38-PRAK signaling pathway.....	16
1.4.1 Mitogen activating protein kinases.....	16
1.4.2 p38 family.....	16
1.4.2.1 p38 discovery.....	16
1.4.2.2 p38 family members.....	17
1.4.2.3 p38 stimuli and upstream modulators.....	17
1.4.2.4 p38 downstream factors.....	18
1.4.3 PRAK.....	19
1.4.3.1 PRAK discovery.....	19
1.4.3.2 PRAK upstream factors.....	19
1.4.3.3 PRAK downstream factors.....	20
1.5 Background.....	21
CHAPTER 2 Materials and Methods.....	22
2.1 Materials.....	22
2.1.1 Mammalian cell lines.....	22
2.1.2 Plasmids.....	22
2.1.3 Enzymes, kits and major reagents.....	22
2.1.4 Antibodies.....	23
2.2 Methods.....	23
2.2.1 Construction of protein expressing plasmids.....	23
2.2.2 Cell culture and transfection.....	24
2.2.3 Immuno-precipitation.....	25
2.2.4 Phos-Tag SDS-PAGE.....	25
2.2.5 Cell size and viability assay.....	25
2.2.6 In-vitro kinase assay.....	26

2.2.7 Rheb GTP/GDP binding assay.....	26
2.2.8 Isoelectric focusing and immunoblotting.....	26
2.2.9 Mass Spectra and phosphorylation site mapping.....	27
2.2.10 Statistics.....	27
CHAPTER 3 Results and Discussion.....	28
3.1 p38β-PRAK signaling is required for mTOR mediated cellular energy stress response.....	28
3.1.1 p38 β ^{-/-} MEF cells are resistant to 2-DG.....	28
3.1.2 PRAK ^{-/-} MEF cells are resistant to 2-DG.....	30
3.1.3 PRAK can reconstitute sensitivity of PRAK ^{-/-} MEF cells to 2-DG.....	32
3.1.4 PRAK ^{-/-} MEF cells are also resistant to other energy stress stimuli...34	
3.1.5 Over-expressed p38 β or PRAK suppresses S6K1 phosphorylation.....	36
3.1.6 2-DG can activate p38 β or PRAK.....	37
3.2 PRAK interacts with Rheb and inhibits its activation on S6K1 phosphorylation.....	40
3.2.1 AMPK is an upstream factor of PRAK.....	40
3.2.2 TSC2 is also an upstream factor of PRAK.....	42
3.2.3 Rheb is a downstream factor of PRAK.....	43
3.2.4 PRAK interacts with Rheb.....	43
3.2.5 PRAK inhibits Rheb activation on S6K1.....	45
3.3 PRAK phosphorylates Rheb on Serine 130.....	46
3.3.1 PRAK phosphorylates Rheb in vitro.....	46
3.3.2 PRAK phosphorylates Rheb on Serine 130 in vitro.....	46
3.3.3 PRAK phosphorylates Rheb in mammalian cells.....	48
3.3.4 Analysis of Serine 130 on Rheb.....	49
3.3.5 MK2 can not phosphorylate Rheb on Serine 130.....	51
3.4 Phosphorylation of Rheb on Serine 130 suppresses its	

activation on mTOR	52
3.4.1 Analysis of phosphorylation effect on Rheb biochemical properties.....	52
3.4.2 Rheb(S130A) has stroger activation on S6K1.....	56
3.4.3 Rheb(S130E) has reduced activation on S6K1.....	57
3.5 Phosphorylation of Rheb by PRAK on Serine 130 is indispensable for 2-DG induced S6K1 dephosphorylation	58
3.5.1 2-DG induces PRAK-dependent phosphorylation of Rheb on Serine 130.....	58
3.5.2 Rheb(S130A) can partially block 2-DG induced S6K1 dephosphorylation.....	59
3.5.3 Proposed model for the role of p38 β -PRAK in mTOR mediated cellular energy stress response.....	60
3.6 Discussion	62
ACKNOWLEDGEMENTS	65
REFERENCES	66
LIST OF FIGURES AND TABLES	80
ABBREVIATIONS	82
PUBLICATIONS	87

摘 要

细胞的生长、分化、分裂等生命过程都需要能量。能量应激反应是细胞维持自身能量稳态，保证胞内生理生化反应正常进行的极其重要的机制之一。mTOR 信号通路通过调控蛋白翻译、细胞生长、自吞噬等方式参与调节细胞的能量应激反应。p38 信号通路是熟为人知的应激反应调节通路。但是人们对 p38 信号通路是否在能量应激反应中起作用仍不了解。我们的研究表明 p38 β -PRAK 激酶级联通路参与调节 mTOR 所介导的能量应激反应。p38 β 或 PRAK 基因缺失都可以阻断 mTOR 所介导能量应激反应。另一方面，能量应激刺激物可以激活 p38 β -PRAK 信号通路。这些结果表明了 p38 β -PRAK 是 mTOR 所介导的能量应激反应所必需的。进而，我们分析了 PRAK 在 mTOR 所介导的能量应激信号通路中的定位，并确立了 p38 β -PRAK 信号通路与 mTOR 信号通路的交联点。我们发现 PRAK 可以结合并体外磷酸化 Rheb。进一步的研究证实 PRAK 可以在能量应激刺激下磷酸化 Rheb 第 130 位丝氨酸。这一磷酸化修饰使得 Rheb 结合 GTP 的能力下降，从而抑制了 Rheb 引起的 mTOR 活化。本研究证明了细胞内的两条重要的信号通路——p38 信号通路和 mTOR 信号通路相交联共同参与调节细胞的能量应激反应。它成为能量应激刺激下 TSC2 调节 Rheb 的一个重要补充机制。更为重要的是，它第一次为我们揭示了以下几个方面：第一，p38 β -PRAK 在细胞内参与能量应激反应的生物学功能；第二，p38 β 具有生理意义的下游底物蛋白——PRAK；第三，PRAK 继 p53 之后的另一个重要的下游底物蛋白——Rheb；第四，mTOR 上游激活蛋白 Rheb 的新的负调控机制——磷酸化修饰。近年来，大量的研究表明 Rheb-mTOR 的非正常活化将导致癌症。这一研究将为寻找攻克 Rheb-mTOR 引发的癌症提供新的策略和新的药物靶点。

关键词：p38 β ；PRAK；Rheb

Abstract

Energy is one of the essentials for cellular growth, differentiation and division. Energy stress response is one of mechanisms that maintain cellular energy homeostasis and keep the biochemical and phyological processes in good condition. mTOR (mammalian target of Rapamycin) signaling pathway is proved to participate in cellular energy stress reponse by controlling protein translation, cellular growth and autophage. In the other side, p38 signaling pathway is well known as a regulatory mechanism that is in charge of celluar stress response. However, it is still unknown whether p38 signaling pathway takes part in this process and what is its role in energy stress reponse. Our research showses that p38 β -PRAK cascade is involved in mTOR mediated energy stress reponse. p38 β or PRAK deletion blocks mTOR mediated energy stress response. Meanwhile, energy stress stimuli, like 2-DG and glucose starvation, can activate p38 β and PRAK. These data demonstrate that p38 β -PRAK cascade is necessary in mTOR mediated energy stress reponse. Furthurmore, we analysed the location of PRAK in mTOR mediated energy stress response signaling pathway. We identified the cross-talk target of p38 β -PRAK cascade in mTOR signaling. PRAK, as a kinase, could bind to Rheb, resulting in the phosphorylation of Rheb in vitro. We also proved that PRAK could phosphorylate serine 130 in reponse to energy stress stimuli in vivo. This phosphorylation modification reduces the GTP binding capacity of Rheb, suppressing its activation on mTOR. Thus, we demonstrates that p38 signaling pathway could cross-talk with mTOR signaling pathway, participating in the regulation of cellular energy stress reposnse. In addition to the regulation of Rheb by TSC2, the phosphorylation of Rheb by PRAK is another mechanism that suppresses Rheb activity in response to energy starvation. This is the first time to reveal the physiological function of p38 β and its substrate in vivo. Also, it reveals another important substrate of PRAK in vivo as well as p53. More importantly, this work also reveals a new post-translational modification of mTOR activator—Rheb. Recently, abberant activation of Rheb-mTOR is proved to contribute to oncogenesis. This work might help in

discovering new strategy and therapeutic target in treating Rheb-mTOR induced cancer.

Key words: p38 β ; PRAK; Rheb

厦门大学博士论文摘要库

第一章 前言

1.1 细胞中的能量应激反应

1.1.1 简介

细胞的能量应激反应是细胞乃至整个生物体维持自身能量稳态的自我调节机制。细胞内无时无刻不在进行着新陈代谢，能量的产生和消耗并存。任何一方面的差错，都会如同波涛汹涌的河流被截去源头或封闭出口，造成不可估量的后果。因而，对细胞内能量水平的感知，以及对细胞能量水平发生的变化作出相应的反应，对于维持细胞生理生化反应的正常运行是十分重要的。

细胞的能量应激反应主要是指当细胞内的能量水平（也就是ATP水平）较低时，细胞通过一系列信号转导通路调节胞内正在进行的生理生化反应，以维持胞内与新陈代谢密切相关的能量收支平衡。我们知道，细胞内的ATP主要在线粒体中产生的。细胞从外界摄入葡萄糖，通过糖酵解和三羧酸循环产生还原力NADH和NADPH。而后这些还原力通过电子传递链的氧化磷酸化作用将电子传递给氧，同时将ADP磷酸化成ATP。在这一过程中，任何一个环节的差错都会影响到ATP的合成，将细胞带入低能状态。这就如同河流的源头被截断了。另一方面，细胞内同时进行着各种各样的耗能过程——大分子物质的合成、转运和降解，例如DNA的合成和修复，脂肪合成，蛋白质的翻译、转运和降解等等。那么，在得到更多的能量物质，使得细胞内的ATP水平回升之前，细胞需要适当地减少胞内的这类耗能过程。否则，就如同河流在源头截流时，若不缩小河水的流出，将会导致河流的枯竭。因而，细胞通过一系列的信号转导通路作出相应的反应，一方面增加胞内产能物质的摄入和ATP的合成；另一方面减少细胞内大分子的合成、转运和代谢。

1.1.2 能量应激刺激物

具体而言，细胞所面临的生理状态的能量应激刺激主要是低糖刺激。人在饥饿时会出现低血糖的现象，表现为头脑眩晕、四肢肌肉无力。这是由于人在饥饿时，血糖较低，而脑部细胞和肌肉细胞供应能量的物质主要是葡萄糖，在低糖和低能状态下的脑细胞与肌肉细胞无法提供正常生理所需要的能量。因而，脑部和四肢出现生理功能的部分丧失，导致上述病理现象。目前科学研究广泛

使用另外两种能量应激刺激物——2-脱氧-D-葡萄糖（2-Deoxy-G-Glucose，2-DG）和阿卡地新（AICA-RIBOSIDE，AICAR）。2-DG是葡萄糖的类似物。它能竞争性结合糖酵解反应中的己糖激酶，从而抑制糖酵解的进行，抑制ATP的合成。AICAR则是AMP的类似物。用AICAR处理细胞，可以模拟细胞内AMP的上升。我们知道，细胞内的ATP，ADP和AMP是不断循环的。AMP的增加，将导致ATP：AMP的比例减小。此外，线粒体是细胞内的能源工厂，它通过呼吸链的氧化磷酸化作用源源不断地将从细胞外吸收、加工并转运到线粒体上的能量物质转化为ATP或其它能量分子。因而，任何可以干扰线粒体正常运作的因素，例如寡霉素（oligomycin）、缺氧、抗霉素A（antimycin A）等，都能造成细胞中ATP合成减少和能量供应不足，引起细胞内的能量应激反应。

1.2 AMPK信号通路

1.2.1 AMPK三聚体

事实上，细胞内存在一类蛋白能与ATP或AMP结合，感知细胞内的ATP或AMP水平。进而，它们将信号加工、放大，传递给细胞内的效应蛋白和功能单位，使之调节胞内的耗能与产能过程，让能量的供与需重新恢复平衡。这就是我们通常所说的能量应激反应。目前，研究较多的主要有两类蛋白——mTOR蛋白复合体和AMPK蛋白复合体。有研究表明，mTOR能与ATP结合，其动力学系数（ K_m ）为1mM左右。但是这比细胞内正常的ATP含量低得多。因而，当细胞内的ATP水平下降到1mM时才能激活mTOR。也就是说，ATP的减少对mTOR的激活需要ATP水平的大幅下降。相反，AMP在胞内的含量较少，因而ATP的微弱变化将导致胞内AMP水平的显著变化，这能很容易地被AMPK蛋白复合体识别。AMPK与AMP结合后转变为活化状态，进而通过磷酸化下游底物蛋白，引起能量应激反应。哺乳动物中的AMPK在细胞内主要以三聚体的形式存在，其中包括激酶催化亚基AMPK α 和两个调节亚基AMPK β 与AMPK γ ^[1,2]。其中，AMPK α 亚基的N末端是一个典型的丝氨酸/苏氨酸激酶结构域，紧接着N末端激酶结构域后的一段氨基酸序列被认为与AMPK α 的自我抑制活性有关。C末端与AMPK的 β 和 γ 亚基结合有关。AMPK β 亚基主要作为AMPK α 和AMPK γ 亚基相互结合的桥梁，起到构架蛋白的作用^[3]。AMPK γ 亚基含有CBS(Cystathionine b synthase)结构域^[4]，它被认为能直接与AMP结合，这一结合可以通过改变三聚体

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库